HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	血管新生阻害剤先行投与がもたらす肺癌免疫療法に与える影響に関する研究［論文内容及び審査の要旨］
Author(s)	佐藤, 峰嘉
Description	配架番号：2763
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第15445号
Issue Date	2023-03-23
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/89952
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	SATO_Mineyoshi_abstract.pdf, 論文内容の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称　博士（医　学）　　氏名　佐　藤　峰　嘉

学 位 論 文 題 名

血管新生阻害剤先行投与がもたらす肺癌免疫療法に与える影響に関する研究

(Studies on the effects of pre-administering an angiogenic inhibitor in immunotherapy for lung cancer)

【背景と目的】　本邦において肺癌は最も罹患者数が多く，予後不良の悪性腫瘍の一つである．近年，進行期術後再発肺癌に対して免疫チェックポイント阻害剤が用いられており，一部の患者では高い治療効果を示している．しかし，多くの患者においては単剤では効果が不十分で，殺細胞性抗がん剤や血管新生阻害剤等が併用されている．多剤併用による化学療法の一つ，カルボプラチン・パクリタキセル・ベバシズマブ・アテゾリズマブ療法においても，患者の予後は十分には改善されていない．

腫瘍血管は正常血管に比し，内皮細胞間接着や周皮細胞による被覆が減弱であるため漏出性が高く，組織間圧が高くなることから無秩序な走行を呈し，血流が障害されている．そのため腫瘍組織内は有効な血液循環が得られず低酸素に陥っており，また薬剤送達性や免疫細胞の浸潤も障害されている．ベバシズマブやラムシルマブをはじめとする血管新生阻害剤は，過剰な血管内皮増殖因子（VEGF）を抑制することで腫瘍血管を正常化し，腫瘍組織内への薬剤送達や免疫細胞浸潤を改善することが知られており，実際の臨床でも腫瘍血管正常化による免疫細胞動員の増加を期待して用いられている．血管新生阻害剤による血管正常化効果が表れるまでに，投与から時間を要することが前臨床モデルで指摘されているが，実臨床では，血管新生阻害剤は免疫チェックポイント阻害剤をはじめとした併用薬と同日に投与されている．そのため，併用薬が投与される時点では腫瘍血管は正常化されていない．すなわち，同日投与では血管新生阻害剤による腫瘍血管正常化効果を十分活用できていないと考えられる．そこで我々は肺癌免疫療法において，血管新生阻害剤の先行投与によって腫瘍血管が正常化したタイミングで他薬剤を投与することにより，現行の同日投与より大きな治療効果が得られるのではないかと仮説を立てた．本研究では，マウス肺癌皮下腫瘍モデルを用いて，血管新生阻害剤の先行投与が治療効果改善につながるかについて，主に免疫組織学的手法を用いて検討した．

【材料と方法】　C57BL/6J マウスにマウス由来肺癌細胞株 Lewis Lung Carcinoma（LLC）もしくは Venus-Rluc 遺伝子導入 LLC（LLC-Venus-Rluc）を皮下注射して，マウス肺癌モデルを作製した．血管新生阻害剤として抗マウス VEGFR2 モノクローナル抗体 DC101 を用いた．薬剤投与後の腫瘍血管正常化のタイミングについて，DC101 投与後，経時的に腫瘍を摘出して評価した．CD31 免疫染色により血管新生阻害効果を解析し，血管正常化を周皮細胞の被覆率で評価した．周皮細胞はαSMA 蛍光免疫染色で可視化した．また，組織の低酸素領域については GLUT1 免疫染色で，腫瘍組織浸潤 CD8 陽性細胞を CD8α蛍光免疫染色で検討した．以上の解析結果で明らかになった血管正常化のタイミングを踏まえ，次に免疫チェックポイント阻害剤との併用療法の効果を検討した．免疫チェックポイント阻害剤として抗マウス PD-1 抗体 RMP1-14 を用い，DC101 の併用療法において抗腫瘍効果を評価した．周皮細胞被覆率と腫瘍組織浸潤 CD8 陽性細胞を上記同様に評価し，腫瘍組織中の PD-L1 の発現率を PD-L1 免疫染色により算出した．また，転移については発光 in vivo イメージングにより検出した．さらに実臨床の治療法に準じて，血管新生阻害剤，免疫チェックポイント阻害剤，殺細胞性抗がん剤の 3 剤併用についても検討した．DC101 と RMP1-14 とパクリタキセルの同時投与と血管新生阻害剤 DC101 先行投与につ

いて，治療効果を比較した．腫瘍サイズの計測により抗腫瘍効果，組織切片のヘマトキシリン・エオジン染色により腫瘍組織壊死を解析した．上記同様の免疫染色法により，微小血管密度や CD8 陽性細胞の浸潤率を解析した．肺転移は摘出肺組織のヘマトキシリン・エオジン染色で検討した．腫瘍組織内の CD8 陽性細胞の活性化状態は，real-time polymerase chain reaction 法により Granzyme B と IFN-γの mRNA 発現により評価した．

【結果】　DC101 単剤単回投与のモデルでは，腫瘍組織内の微小血管密度は投与 7 日後までは低下していたが，14 日後には再度上昇した．血管正常化の指標の一つである周皮細胞による血管の被覆は，DC101 投与３日後に最大になった．腫瘍組織低酸素領域も投与 3 日後に最大となり，血管の正常化が血流を改善したことが示唆された．また，CD8 陽性 T 細胞の腫瘍組織浸潤も投与 3 日後に増加する傾向がみられた．これらの結果から，このモデルでは DC101 投与３日後に最も血管が正常化されると考えられた．これらの結果を踏まえ，DC101 と RMP1-14 の併用療法では，2 剤の同時投与と DC101 の３日先行投与を比較した．腫瘍増殖は DC101 先行投与群で抑制される傾向がみられた．CD8 陽性細胞の浸潤は先行投与群で増加する傾向がみられた．腫瘍内の PD-L1 の発現を検討したところ，同時投与群で先行投与群より有意に減少し，免疫チェックポイント阻害作用により腫瘍細胞がより除去されたことが示唆された．最後に DC101 と RMP1-14 とパクリタキセルの併用療法では，無治療群，DC101 なし群，DC101 同時投与群と先行投与群の比較を行なった．DC101 先行投与群にて最も大きい腫瘍増殖抑制効果が得られた．組織学的な解析においても壊死領域が最も拡大しており，生存する癌組織が減少したことが示された．腫瘍組織内の微小血管密度は血管新生阻害剤投与群で少なく，血管新生阻害剤による血管新生阻害効果がみられた．腫瘍浸潤 CD8 陽性細胞数は DC101 先行投与群で多い傾向がみられた．CD8 陽性細胞の Granzyme B および IFN-γの mRNA 発現は血管新生阻害剤投与群で高くなる傾向がみられ，血管新生阻害剤の投与ががん免疫を活性化することが示唆された．

【結論】　血管新生阻害剤先行投与によって腫瘍血管があらかじめ正常化されることで，後続して投与する免疫チェックポイント阻害剤をはじめとした併用薬の効果が増強されることが示唆された．血管正常化によって免疫細胞の浸潤が促進されたこと，免疫細胞機能障害の要因にもなる低酸素等の腫瘍微小環境が改善されたこと，また併用薬の薬剤送達が改善したことがその機序として考えられる．以上より，血管新生阻害剤の量や種類の変更ではなく，投与タイミングの変更のみで免疫療法などの治療効果が改善される可能性が示唆された．肺癌患者の免疫療法において，血管新生阻害剤を先行投与する併用療法が新たな治療戦略になり得ることが示唆された．